

8. 現在までの働きかけとそれに対する反応		
誰（どこ）が	誰（どこ）に	どのような働きかけをしたかと、それに対する相手の反応、進行状況
久留米大学 小児科 古賀靖敏	味の素株式会社	上記論文をもとにアルギ II を用いた臨床試験（二重盲検法）、多施設間検討（phase II）が準備中。しかし、現在は味の素株式会社内での採算性が問題になり、治験開発としての実現が困難な状況である。今後、味の素株式会社へ各専門学会からの要望書および要請書をお願いし、会社として治験開発を行っていただけのように働きかける。また、会社としての採算ベースで治験開発が困難と判断されるのであれば、医師の自由研究として、単独での治験開発を国に働きかける必要がある。現在は、味の素株式会社内で採算面で治験開発にストップがかかっている状態である

以上の理由で、医師主導型の治験が行われなければ、この薬剤での治療法の確立が不可能である。

# 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

L-アルギニンの脳神経終末神経伝達物質輸送機構に及ぼす影響に関する研究  
（マウス脳，粗シナプトソームのアミノ酸動態）

分担研究者 平田孝治 久留米大学医学部助手

研究要旨 脳シナプトソームにおけるL-アルギニンの新たな作用機作を考察するために、神経情報伝達機構を主点に、GluとGABAのアミノ酸動態を中心に生化学的諸性質を検討した。結果、Glu/GABAのシナプトソーム内小胞輸送は、ロテノン存在下、アルギニン投与後のGlu/GABAの取込は減少傾向を示した。一方放出はL-アルギニン添加時に増加傾向を示し、KCl溶出で減少傾向を示した。粗シナプトソームにおいて輸送小胞へのアミノ酸取込と放出がL-アルギニン添加時に駆動すると考えられ、L-アルギニンのシナプトソームに対する何らかの機作が存在すると推察された。

#### A. 研究目的

脳卒中様症状を伴うMELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) 患者の急性発作時、L-アルギニン治療により症状が改善することが主任研究者によって報告された<sup>1)</sup>。これは脳血管拡張作用により虚血部位の脳血流量を高めることが、作用機転と考えられている。一方L-アルギニンを投与することで頭痛嘔吐症状等の緩和以外に、痙攣消失、意識改善等が観られ、さらに脳卒中様症状の予防効果も観られている。急性期臨床症状の改善においては、スコア化され、30分後という早い段階で改善率がおおよそ70%程度にまで達することが報告<sup>1)</sup>されており、改善の効果は、L-アルギニンの効果が血管内皮依存性血管拡張作用以外にも、脳神経系等に何らかの作用を与えている可能性が考えられる。

ミトコンドリアは、エネルギー(ATP)を生産する細胞内小器官であり、脳神経終末(シナプトソーム)に存在するミトコンドリアは、神経伝達物質輸送にとってそのエネルギー依存度は非常に高いと言える。特にシナプトソーム内ミトコンドリアの機能低下は、MELASを代表とするミトコンドリア脳筋症の精神異常や運動発達遅延、知能低下、痙攣や脳卒中様症状等の臨床症状と深く関わっているものと推察される。

本研究では実験動物を用い、脳神経終末における神経伝達物質輸送活性(Synaptosomal Uptake, Release)を指標とした生化学的諸性質の検討を行った。

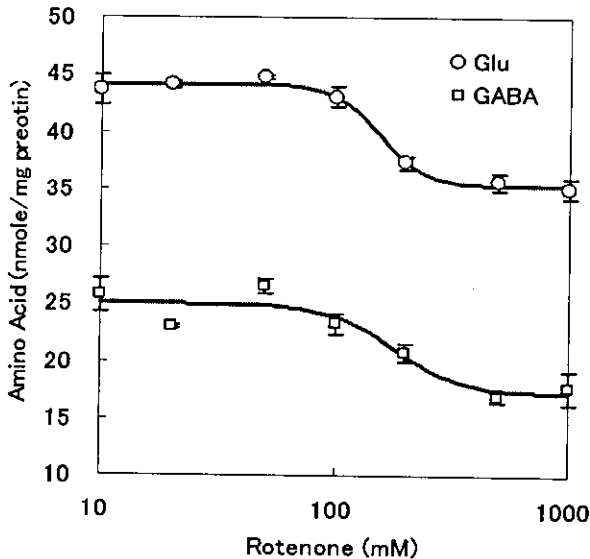
#### B. 研究方法

本研究では6~12週令の若年正常マウス(1 CR)脳から、Krugerらの方法<sup>2)</sup>に準じ粗シナプトソームを調製した。粗シナプトソームはKrebs Ringer液を用いて、6時間以内に実験に使用した。ミトコンドリア機能低下に対しては、呼吸鎖酵素複合体Iの阻害剤であるロテノンを用いた。主任研究者は、患者へのL-アルギニン投与前、投与終了後における血中L-アルギニン濃度が15分後に最大約10mMになることを示したことから、その最大濃度を12.5mMとして試験した。神経伝達物質であるGlutamateおよびGABAを分析対象とし、その動態はアミノ酸全体の定量的動態解析を試みるため、ニンヒドリン発色系アミノ酸分析機(JLC-500/V)に供した。

シナプトソームへのGlu/GABAの取込(Synaptosomal Uptake)は、Ozawaら他の方法<sup>3)</sup>に準じ、メンブランフィルタを併用した遠心分画法によって、3画分[細胞質画分、ミトコンドリア、膜画分を含むオルガネラ画分(ミトコンドリア画分)、輸送小胞を含む小胞画分]に分画後、分析を行った。放出(Release)は、Sandvalらの方法<sup>4)</sup>に準じ、高KCl-Krebs Ringer液による脱分極によって生じさせ、遠心-バッチ法によって分画し分析を行った。酸素消費測定においては、YSI酸素電極を用い、Ozawaら<sup>3)</sup>他の方法<sup>6)</sup>に準じ、Krebs Ringer液中において、State 3の酸素消費速度を測定し、シナプトソームの呼吸状態の指標とした。

#### C. 研究結果

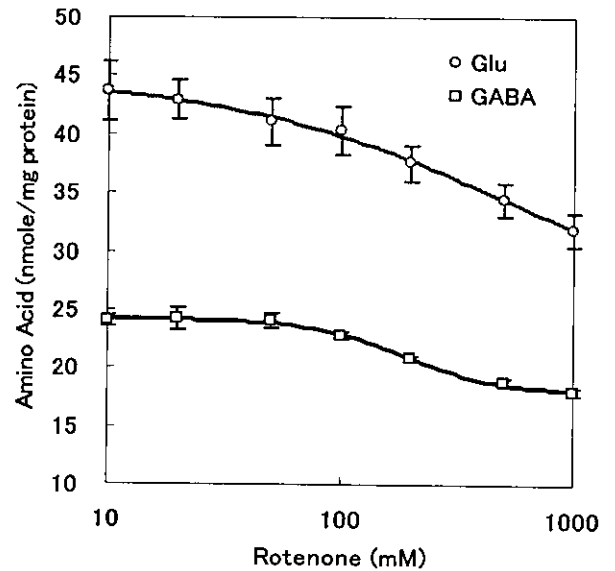
ロテノンによるGlu/GABAのUptake阻害を明らかにするために先ず、そのロテノン濃度依存性を調べた(図1)。シナプトソーム内取込は、ロテノン 200 $\mu$ M (約30nmole/mg of protein)付近で、Glu/GABAのいずれに対しておよそ70%取込阻害を与えプラトーに達したことから、ほぼこの濃度で取込阻害されるものと分かった。この結果、Glu/GABAは同様に、ラットならびにモルモットで報告されているロテノンのシナプトソームへのドーパミンならびにComplex 1活性阻害における濃度依存性と一貫性があった5)。3画分のアミノ酸量に関しても同様に図1に示す濃度依存性の結果が示された。これら取込に対するロテノンの存在下、L-アルギニン12.5mMを添加し、その影響を調べた。その結果を図2に示すように、シナプトソーム取込阻害に対して、GABAは若干の減少傾向はあるものの大きな差違を示さなかった。しかしながら、Gluに対してはDose Response 曲線を示さず、ロテノン濃度の上昇に伴って緩やかな減少傾向を示すことが分かった。



1 ロテノンによるシナプトソーム内取込阻害

この結果はアルギニンがシナプスに対して選択的に作用していることが考えられる。これは、アルギニンはロテノンの阻害に関わらずシナプトソーム内のGlu contentを減少させており、Gluがシナプトソーム外へ放出される結果を示唆している。分画後の3画分において同様の測定を行った。Glu/GABAともに細胞質画分では図2同様の結果が示された。ミトコンドリア画分では両者とも若干アミノ酸量は減少を示しアルギニン非存在下同様用のDose Response 曲線を示した。また小胞画分ではいずれもアミノ酸量の減少を示し、そのIC50値は若干低濃度ロテノン側にシフトす

る傾向が観られた。



2 L-アルギニンのシナプトソーム内取込阻害に及ぼす影響

Uptakeの測定結果から、アルギニンによってGlu/GABAのシナプトソーム内アミノ酸量は減少し、ロテノンの阻害に関わらずGluは放出していることが考えられた。L-アルギニンによる放出を確認するために、Releaseの測定を行った結果、アルギニン添加時にGluならびにGABAは放出され、この間オルニチンも検出された。一方その後のHigh Kによる放出量は減少した。以上のことから、Gluはアルギニンによって放出が比較的強く促され、一方GABAではシナプトソーム内取込量に大きな変化が無いにも関わらず放出されていることから、取込と放出が促されていることが考えられた。アルギニン添加時にオルニチンが確認されたことから、尿素サイクルの存在が示唆され、このサイクル促進とUptake/Releaseと何らかの関与があるかも知れない。アルギニン-シトルリン経路(NO産生)が血管拡張作用の起点となっているが、本実験でシトルリンの検出には至らなかった。

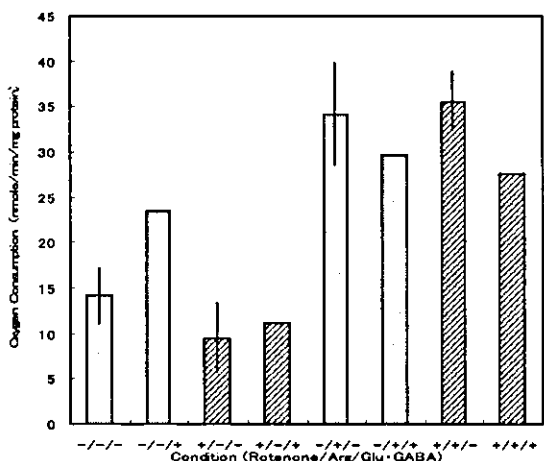


図3 酸素消費の影響

L-アルギニンの影響を酸素消費の側面から分析した。その結果を図3に示す。ロテノン存在下においては、Glu/GABA存在に関わらず、酸素消費速度は減少しており、このことは呼吸鎖阻害との一貫性を示している。アルギニンが存在するとロテノン存在に関わらず、その酸素消費を1.5~2倍程度増加することが分かった。このことはアルギニンが呼吸鎖系あるいはTCAサイクルを促進する間接的な作用機作が存在することが示唆される。

#### D. 考察

今後は、更に詳細な分析と試料測定数を増やすことが望まれる。粗シナプトソームにおいてはグリオソームやその他の膜小胞が混在するため、厳密にはシナプトソームを精製する必要がある。しかしながらシナプトソームを単離し取込増減測定をルーチン化することは非常に困難なため、多くの研究報告と同様に本実験に留めざるを得ない。新たな分析手法も検討が必要と思われる。現在、粗シナプトソームの電子顕微鏡像確認とそのシナプトソーム存在比率等の検討など、補間検討中である。

#### E. 結論

粗シナプトソームにおいて輸送小胞へのアミノ酸取込と放出がL-アルギニン添加時に駆動すると考えられ、L-アルギニンのシナプトソームに対する何らかの機作が存在すると推察された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Povalko N, Zakharova E, Rudenskaia G, Akita Y, Hirata K, Matsuishi T, Koga Y. A new sequence variant in mitochondrial DNA associated with high penetrance of Russian Leber hereditary optic neuropathy. Mitochondrion 2005 (in press)

#### 2. 学会発表

平田孝治、秋田幸大、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏、マウス脳神経終末アミノ酸の動態。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

石田香織、西岡淳子、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏。ミトコンドリアDNA全周シーケンスシステムの構築。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

秋田幸大、柗山了、平田孝治、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、富田祐子、古賀靖敏。頭痛を伴う意識消失発作と糖尿病を呈するミトコンドリア機能異常症と考えられた症例。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

西岡淳子、石田香織、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏。発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例：ミトコンドリア全周シーケンス解析法をふまえて。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

Akita Y, Hirata K, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Mitochondrial energy metabolism in the klotho KO mouse. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

Hirata k, Akita Y, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Effect of L-arginine on the neurotransmission and the mitochondrial respiration of mice brain synaptosome. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

Ishida K, Akita Y, Povalko N, Hirata K, Nishioka J, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: The entire mitochondrial DNA analysis of 9 MELAS patients with an A3243G mutation. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

#### H. 知的財産権の登録・出願状況

特になし

Entire mitochondrial DNA sequence analysis in Russian LHON familiesに関する研究

分担研究者 Povalko Nataliya 久留米大学医学部助手

**研究要旨** We have analyzed mitochondrial DNA sequence in 15 Russian LHON patients and found the new mtDNA polymorphism in one family (2 patients) who showed 100% penetrance of the disease. This family has a T14484C primary mutation, and 4 secondary mutations (T4216C, G 13708A, G 15812A, G15257A), which belong to the European haplogroup J. The new polymorphism of A9016G in the ATPase 6 gene changed highly conserved amino acid of isoleucine to valine, has not been found in the rest of 13 LHON patients and controls. This novel polymorphism may contribute to the 100% penetration of LHON disorder in this family.

A. 研究目的

Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON [MIM 535000]) is a maternally inherited genetic disorder associated with point mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA) that cause blindness in young adults (Wallace et al., 1988; Howell, et al., 2003). It is characterized by acute or subacute, progressive, and bilateral loss of central vision due to focal degeneration of the retinal ganglion cell layer and optic nerve. Common primary LHON mutations are G 3460A, G11778A, and T14484C not in association with each other, heteroplasmic and absent among control are necessary for expression of the disease but not sufficient (Man et al., 2002). Secondary/intermediate LHON mutations showed different frequency pattern among the three classes of above common primary mutations in positive patients and controls, usually homoplasmic, and may contribute to the LHON by increasing the probability of expressing the phenotype (Torrioni et al., 1997). A. 研究方法 Patients.

Fifteen patients from 13 unrelated Russian families were fulfilled the clinical criteria of LHON. Three women and twelve men from 10 to 56 years old with mean age of onset about 22.3 years. The research followed the tenets of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained

from the patients after explanation of the nature and possible consequences of the study. DNA was taken and studied for the various mtDNA mutations. One family which has the highest penetrance among our 13 unrelated families is shown in Figure 1. The proband is a 35-year-old Caucasian man, who suffered from a rapid bilateral painless loss of central vision. The loss of vision began at the age of 18 years, and at the same period, the patient was admitted to the hospital with diabetic coma due to insufficient insulin production. He had a 6-month interval between the blindness in both eyes which was not caused by diabetic retinopathy. The visual acuity is 0.02-0.03 with the central scotomas. Bilateral loss of central vision was also detected in patient's mother, a 56-year-old woman, when she was 47 years old. She had two brothers and two uncles who were completely blind from their youth, showing 100% penetrance of LHON disease in men of maternal lineage. There is no family history of diabetes mellitus, deafness or neuromuscular disorders except blindness.

**Sequencing analysis.**

Total DNA was extracted from white blood cells using the standard method (King et

t al., 1992). The complete mitochondrial genome was amplified by long-PCR method in 7 overlapping fragments using 14 primers (Table 1). The PCR conditions were: first, one cycle of 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 57 °C for 1 min, 72 °C for 3 min, and finally, one cycle of 72 °C for 5 min followed by cooling to 4 °C. The quality and quantity of template DNA were determined by 1% agarose gel electrophoresis. ExoSap-IT (USB Corporation, Ohio USA) utilizes two hydrolytic enzymes Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase together in a specially formulated buffer, to remove unincorporated dNTPs and primers. The ExoSap-IT was added directly to the PCR product. After treatment, ExoSap-IT was inactivated simply by heating to 80 °C for 15 minutes. Using 40 forward primers (Table 2) and CEQ Dye Terminating Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA), sequence reaction was performed as following: first, one cycle of 96 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 96 °C for 20 sec, 50 °C for 20 sec, 60 °C for 3 min, and finally, one cycle of 60 °C for 5 min followed by cooling to 4 °C. The sequences were assembled in a contig using the program DNA SIS Pro (Hitachi Software Engineering Co, Ltd, Tokyo, Japan) and the resulting contig was aligned to the Cambridge sequence (Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999).

#### PCR-RFLP analysis.

To confirm the heteroplasmic condition in primary and secondary mutation reported in LHON, or novel mutation, we performed the PCR-RFLP analysis using suitable sets of primers and restriction enzymes (Brown et al., 1995; Brown et al., 2001). Conditions for all PCR amplifications were as follows: first, one cycle of 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55.5 °C for 1 min, 72 °C for 45 sec, and finally, one cycle of 72 °C for 5 min followed by cooling to 4 °C. Diagnostic restriction endonuclease digestions were resolved by 12% polyacrylamide gel el

ectrophoresis, and the DNA fragments were identified by ethidium bromide.

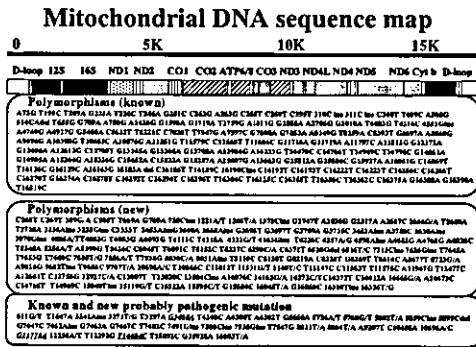
For new A9016G mutation, we designed a set of primers as following: forward from np8833 to np8852 and reverse from np9140 to np9121 (5' -3' ). This fragment contains a single restriction site for HpyCH41V in the presence of mutation. To eliminate partial enzymatic digestion, all restriction enzyme reactions were carried out overnight, followed by the addition of 10 units of enzyme and 2 additional hours of incubation. Percentage of mutation was quantitated by one-dimensional densitometry using Image Quant software version 4.1 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

#### C. 研究結果

All nucleotide changes found in our study are shown in Table 3. Seven patients from 5 unrelated families have one of the primary mutations. Two unrelated patients (patients 1 and 7) have a G11778A mutation. One of them (patient 7: haplogroup J) has two secondary mutations of T4216C and G13708A, however, the other (patient 1: haplogroup W) has no secondary mutation. Three patients (2 families) have a G3460A mutation, one family (patients 4 and 5: haplogroup X) has no secondary mutations, and the other (patient 6: haplogroup T1) has a T4216C and A4917G mutations. Patients 2 and 3 (mother and son) belong to haplogroup J and have a primary mutation of T14484C and secondary mutations of a T4216C, G13708A, G15257A, and G15812A. Eight patients from 8 families (patients from 8 to 15) have no known primary mutation in their mtDNA, however 3 patients (patients 8, 12, and 13) from this group have one of the secondary mutations of G13708A or A4917G. Remaining 5 patients have none of pathogenic mutations reported before. Moreover, we have found a novel polymorphism of A9016G in the ATPase 6 gene in mother and son (patients 2 and 3) who have a primary mutation of T14484C (Figure 2).

Among 13 unrelated families from Russian LHON, distribution of mtDNA haplogroups were as follows: 23% for haplogroup H (n=3) ; 23% for haplogroup J (n=3) ; 15.4 % for haplogr

oup X (n=2) ;15.4 % for haplogroup T (n=2) ; 7.7 % for haplogroup U2 (n=1) ; and 7.7 % for haplogroup M (n=1).



**Results**

Patient/mutation	A	B	C	D	E	F
Primary	G11778A	-	-	T14484C	T14484C	-
Secondary	-	-	-	T4216C G13708A G15812A	T4216C G13708A G15257A	-
Pathogenic?	A4308T		G11G/T			T2354A/T

Patient/mutation	G	H	I	J	K	L
Primary	-	-	G3468A	G3468A	G3468A	G11778A
Secondary	G13708A	A4917G	-	-	T4216C	G13708A
Pathogenic?	A306A/T	G15928A				

D. 考察LHON is characterized by incomplete penetrance and men are preferentially affected (68%) when the primary mutation of T14484C exist (Wallace et al., 2001). Since our family (patients 2 and 3), who showed 100% penetrance of the disease in three generations, has the nucleotide changes at C5633T, A11251G, A12612G, and C15452A in addition to primary mutation of T14484C in the homoplasmic condition, (Herbst et al., 2002) they are constituent of European mtDNA haplogroup J background which is present in European population at a frequency of 9 %. The other factors such as smoking, alcohol excess, diet, psychological stress, exposure to toxins, head trauma have been among the epidemic factors suspected of increasing the penetrance of LHON (Tsao et al., 1999). However in our family, there are no obvious risk factors to increase the penetrance of this disorder. We found the novel A9016G mutation in both mother and son in this family. This mutation was heteroplasmic and results in a substitution of isoleucine

for valine at a highly conserved residue in the ATPase 6 polypeptide (Figure 3). It dramatically changes the hydrophobicity profile and the secondary structure of ATPase 6 in combination with A8860G polymorphism which changes amino acids of threonine to alanine. Hence, this is likely to be pathogenic mutation according to above information (Riordan-Eva and Harding, 1995; Brown et al., 2002). This mutation has not been reported in the literature, MITOMAP and mtSNP database, and has not been found in 13 Russian LHON patients and in 30 Japanese individuals. Though a number of studies have failed to make the important distinction between frank pathogenic mtDNA mutations and haplogroup-associated polymorphism (Chagnon et al., 1999; Lin et al., 1992), this A9016G mutation may increase the penetrance of the disease in LHON, when it is associated with the primary mutation of T14484C and secondary mutations of a T4216C, G13708A, G15257A, and G15812A. In addition, this family has the unique combination of the following polymorphisms of A9494G, G11718A, A15662G, and C16193T which are reported in the literature, however, they are not present in the rest of 12 families in this study. We could not perform further biochemical analysis in this index family, because specimens were not available. Thirty-seven to fifty percent of LHON having T14484C primary mutation are reported to be recovered within 16 months interval (Wallace et al., 2001, Web site of Mitochondrial Research Society). However we have not observed such recovery of blindness in the members of this family. Though the pedigree is so small and additional biochemical data is not available in this study, we suggest that an A9016G mutation is specific for this family and may increase the penetration of LHON with the combination of secondary mutations (Mackey, 1994). Above information will continue to provide us with new insights into the pathophysiology of mitochondrial disease.



F. 健康危険情報

なし

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Tanabe Y, Fujimoto S, Matsuishi T: L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. *Neurology* 2005 Feb;64(4):710-712.

Povalko N, Zakharova E, Rudenskaia G, Akita Y, Hirata K, Matsuishi T, Koga Y. A new sequence variant in mitochondrial DNA associated with high penetrance of Russian Leber hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion* 2005 (in press)

2. 学会発表

古賀靖敏、秋田幸大、西岡淳子、Povalko Nataliya、松石豊次郎：MELAS急性期および寛解期におけるL-アルギニン療法。第46回日本小児神経学会。2004.7.15-17（東京）

Povalko Nataliya、秋田幸大、西岡淳子、古賀靖敏：ロシア人Leber遺伝性視神経萎縮症家系における全周ミトコンドリアDNA解析。第46回日本小児神経学会。2004.7.15-17（東京）

平田孝治、秋田幸大、Povalko Nataliya、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏：老化モデルマウスと正常加齢マウスのミトコンドリアエネルギー代謝・組織化学的相関。第4回日本ミトコンドリア研究会年会。2004.12.16-19（東京）

Povalko N, Akita Y, Hirata K, Nishioka J, Koga Y: A novel point mutation associated with high penetrance of

Russian Leber's hereditary optic neuropathy. 第4回日本ミトコンドリア研究会年会。2004.12.16-19（東京）  
Koga Y, Koga A, Akita Y, et al. Mitochondrial RNA processing intermediates showed dominant negative effects in mitochondrial myopathies. International Congress of Neuromuscular Disorders. 2002.7.6 (Vancouver, Canada)

Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Povalko N, Matsuishi T: MELAS and L-arginine Therapy. 6th European Meeting on Mitochondrial Pathology.2004.6.30- 7.4 (Nijmegen, Holland)

Povalko N, Zakharova E, Akita Y, Nishioka J, Koga Y: Entire mtDNA sequence analysis in Russian LHON family. 6th European Meeting on Mitochondrial Pathology.2004.6.30- 7.4 (Nijmegen, Holland)

Akita Y, Hirata K, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Mitochondrial energy metabolism in the klotho KO mouse. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

Hirata k, Akita Y, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Effect of L-arginine on the neurotransmission and the mitochondrial respiration of mice brain synaptosome. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

Ishida K, Akita Y, Povalko N, Hirata K, Nishioka J, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: The entire mitochondrial DNA analysis of 9 MELAS patients with an A3243G mutation. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

ミトコンドリアDNA全周塩基配列の決定とMELAS患者の全周解析に関する研究

分担研究者 石田香織 久留米大学医学部助手

**研究要旨** ミトコンドリア遺伝子の変異速度が核DNAに比較して10倍速いことからミトコンドリアDNAの全周塩基解析を行いtRNA<sup>Leu</sup>(UUR)遺伝子のA3243Gのヘテロプラスミー以外に臨床症状の重症度に相関する変異を検索した。ミトコンドリアDNA全周シーケンス法を決定し、MELAS患者の塩基配列を検索、解析をし、PCR-RFLP法による変異確認を行うことは、病気の臨床像の病因遺伝子の相関をみる上で有用と考えられる。ミトコンドリアDNA全周シーケンスシステムの構築を試み、効果的に解析が可能になったので報告する。

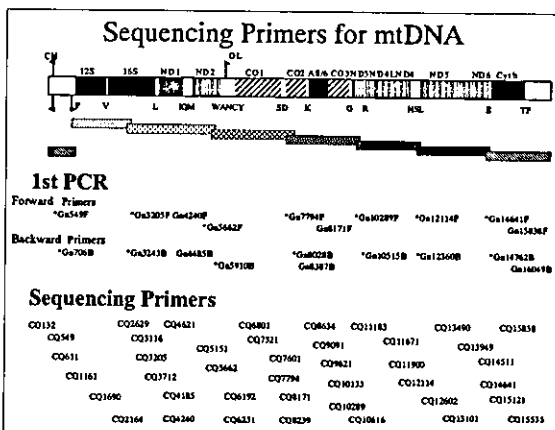
**A. 研究目的**

ミトコンドリア異常症の臨床的多様性を考える場合、生化学的異常に影響を与えるミトコンドリアDNAの塩基配列、その多型は無視できない。よってミトコンドリアDNA全周シーケンス法を決定し、MELAS患者の塩基配列を検索、解析をし、PCR-RFLP法による変異確認を行うことは正確に変異の存在確認ができる最も有用な方法であると考えられる。今後の分子遺伝学的検査のひとつとして、ミトコンドリアDNA全周シーケンスシステムの構築を試みたので報告する。

**B. 研究方法**

臨床的にMELASを疑われている患者の末梢血、もしくは生検筋よりDNAを分離使用する。この分離DNAを鋳型とし16,569bp塩基対の大きさがあるミトコンドリアDNA全周を、LA・TaqDNAポリメラーゼ（タカラバイオ社）を用いたロングPCR法で7つの断片（図1）に分割し増幅させる。

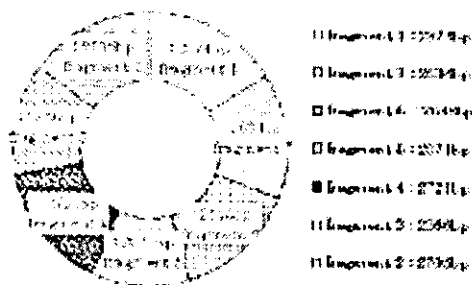
応を行う。シーケンス反応では、さらに各PCRフラグメントから細かく分け、最終的には43個の短いフラグメントでミトコンドリアDNA全周を網羅しシーケンス反応を行う。図2に各フラグメントと対応するプライマーの配置図を示している。



なお、PCRフラグメントは100bpづつ、シーケンスフラグメントは50bpづつオーバーラップするように配置している。またPCR用プライマー（Gn）はゲル濾過精製、シーケンス用プライマー（CQ）は逆相HPLCカラムによる分離精製を施し、ミトコンドリアDNAを特異的に増幅し、さらにプライマー3'末端に含まれる8塩基にわたるリピートフラグメントは含まないようなデザインになっている。

シーケンス反応は簡便化をはかるために、シーケンサーCEQ8000（ベックマンコールター社）とは別売りされているDTCSキットをそのプロトコール通りに使用している。シーケンス反応後はエタノール沈殿を経て、シーケンサーCEQ8000により、15時間から16時間かけてミトコンドリ

図1. Mitochondrial DNA and fragment size



PCR後は電気泳動による確認を行い、そこで得られた7つのPCR産物を鋳型にしてシーケンス反

ア全塩基配列を解析する。この後にMacMolly解析ソフトにより解析しチャート比較、アライメントをすることで、すでに報告された変異やポリモルフィズムに加え、新たに未報告の変異やポリモルフィズムを得る事ができる。さらに、この解析データ、シーケンス波形を照らし合わせ、アミノ酸置換が生じているか否かをミトコンドリア遺伝子コードから推定する。

2. 9例のMELASを疑われる患者の末梢血(うち2例は生検筋)を用いて、上記のシーケンス方法によるミトコンドリアDNAの全周塩基配列決定を行ったところ、全てにA3243G変異を認めた(制限酵素Hae IIIにより存在確認を行った)。さらにこの変異の他に、各検体に平均して40~60箇所の塩基置換があることが分かった。未報告変異に関しては、シーケンス波形で確認をしながら、ポリモルフィズムとヘテロプラスミーの区別を行い、ヘテロプラスミーが疑われるものに関しては、PCR-RFLP法により、変異の存在確認を進めている。

#### C. 研究結果

#### D. 考察

以上の方法により、短時間でかつ簡便にミトコンドリアDNA全周シーケンス決定できるシステムを構築できた。しかし、43シーケンスフラグメントのなかには解析が難しい箇所も存在しており、さらに改良を必要としている。

上記で述べたシステムであれば3日で全塩基配列を読むことが可能であり、病因変異の確認以外に新しい変異の発見も期待できる。また新しく発見された塩基置換がMELASの病因変異と深く関わっている可能性もあるため、ヘテロプラスミーと病因変異との相乗効果による重症度、発症度の違い、相関性を明確にする方法を検討していく。

#### E. 結論

ミトコンドリア病のサブタイプで最も多いMELASは日本で230ほど存在するが、その自然歴はいまだわかっていない。本例はMELASの初回発作から電撃的に経過し、死の転帰をむかえた症例である。本症例のようなMELAS患者に対して、発症からの経時的画像変化を試みた。SPM: statistical parametric mapping法は、ロンドンのFriston KJらによって開発されたソフトウェアであり、SPECT等の脳賦活検査で得られたcontrol群に対し統計学的に有意に変化した領域を画像解析する手法である。今回の

本患者の経時的なSPM-SPECT所見では、急性期での局所的な脳血流量の低下を確認し得た。この結果は成人MELAS例で報告されるものと異なる結果であるが、これに関しては各々画像を得た臨床時期の違いによるものと考えられる。あるいは、成人と小児間で血管内皮機能不全による血管機能異常に対する反応に差があるのかもしれない。剖検では生前の臨床所見からは確認し得なかった肥大型心筋症の所見を得ており、現疾患の死線期に感染が加わり死に至った症例であると考えられた。

MELASの死因は、さまざまであるが多くは、脳梗塞様病変に心筋症や腎症を合併しており、末期に肺炎等の感染症が加わって死に至る症例が報告されている。MELASの増悪因子として、主要臓器の直接的な機能障害が致死的になると考えられる。さらに、今回のように臨床的に高い重症度を示した症例を、分子遺伝学的に解明する目的でミトコンドリアDNA全周シーケンス解析、各臓器別点変異率の解析をおこなった。ミトコンドリア遺伝子上でA3243G変異を示していたが、現時点では重症なMELAS患者である本例に、その遺伝学的背景を裏づけするような根拠となる結果がいまだ得られていない。現在は家系検索などもすすめているが、MELASの病態の解析に、今回新しく検索された多型遺伝子との関連や核遺伝子異常との関連性を引き続き検討していく予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

西岡淳子、古賀靖敏. 小児の悪性高熱症、悪性症候群、横紋筋融解症の臨床像と病態および治療. 小児科 2003; 44(13): 2109-2117.

Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Tanabe Y, Fujimoto S, Matsuishi T: L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. Neurology 2005 Feb;64(4):710-712.

##### 2. 学会発表

平田孝治、秋田幸大、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏. マウス脳神経終末アミノ酸の動態. 第3回日本ミトコンドリア研究会年会. 2003.12.18-20 (福岡)

石田香織、西岡淳子、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏. ミトコンドリアDNA全周シーケンスシステムの構築. 第3回日本ミトコンドリア研究会年会. 2003.12.18-20 (福岡)

秋田幸大、柗山了、平田孝治、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、富田祐子、古賀靖敏。頭痛を伴う意識消失発作と糖尿病を呈するミトコンドリア機能異常症と考えられた症例。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20（福岡）

西岡淳子、石田香織、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏。発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例：ミトコンドリア全周シーケンス解析法をふまえて。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20（福岡）

古賀靖敏、秋田幸大、西岡淳子、柗山了、植木勲、松石豊次郎：MELASの脳卒中様発作急性期および寛解期におけるL-アルギニン療法の効果。第107回日本小児科学会総合シンポジウム3「小児の難病はどこまで治るようになったか」。2004.4.9-11（岡山）

西岡淳子、古賀靖敏、秋田幸大、植木勲、後藤憲

志、江上公康、柗山了、松石豊次郎：発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例：ミトコンドリア全周解析法をふまえて。第107回日本小児科学会。2004.4.9-11（岡山）

秋田幸大、柗山了、植木勲、西岡淳子、古賀靖敏、松石豊次郎：意識消失発作を契機に糖尿病と診断され、mtDNA異常G3316Aを認めた症例。第107回日本小児科学会。2004.4.9-11（岡山）

古賀靖敏、秋田幸大、西岡淳子、松石豊次郎：MELASにおけるL-アルギニン療法。第45回日本神経学会。2004.5.11-14（東京）

老化モデルマウス(Klotho kl/klマウス)の腎におけるミトコンドリア機能解析に関する研究

分担研究者 秋田幸大 久留米大学医学部助手

研究要旨 Klotho遺伝子欠損マウスは、単一遺伝子欠損老化モデルとして偶然発見されたモデルマウスであるが、その老化機構に関するエネルギー産生系の解析は未だ成されていない。本研究の目的は、このマウスにおける老化症状の進行状態とエネルギー産生機構の関心に焦点を絞り、老化機構の分子基盤を解明する。それにより、神経症状進展を予防する新しい治療法開発に、大きく寄与出来ると考えられる。

A. 研究目的

*klotho*遺伝子欠損マウスのホモ個体(kl/klマウス)は、生後3~4週以降の早期に老化徴候を示し、7~8週で死に至る老化モデルマウスとして知られている。鍋島らのグループが発見した老化調節遺伝子であるKlotho遺伝子が、主に腎に発現しており腎機能低下や腎不全との病態との関連が報告されている。本研究では*klotho*遺伝子欠損マウスと正常加齢マウスの老化現象に関わるミトコンドリア機能の違いを明らかにすることを目的とし、腎臓に絞り、酵素生化学的なミトコンドリアのエネルギー代謝と組織化学的解析を行った。

B. 研究方法

野生型+/+マウスを対照とし、生後7~8週齢のKlotho kl/klマウスの発育状態を比較検討した。障害の程度が強い腎において、光顕組織化学的、電子顕微鏡的検索、同時に分離ミトコンドリアを用いた電子伝達系酵素活性と酸素消費量を測定した。また、遺伝学的分子基盤を検討する目的で、異なる老化過程でのマウスミトコンドリアDNAの全周解析を行った。

C. 研究結果

Klotho kl/klマウスは生後4週を過ぎる頃より発育低下を認めた。Klotho kl/klマウスにおける腎の病理組織学的所見では尿細管部に石灰化を、動脈中膜に石灰化や内膜肥厚を呈する動脈硬化を認めた。また、ホモ個体(kl/klマウス)の腎ミトコンドリア画分は、対照と比較して酸素消費、電子伝達系酵素活性いずれも有意に減少した。

D. 考察

今回の結果は、Klotho kl/klマウスの腎ではミトコンドリア機能低下を伴っている事が証明された。細胞のエネルギー危機が種々の老化現象に関わっている直接的な証拠として注目される。今後もミトコンドリアエネルギー産生機能低下とミトコンドリア遺伝子異常との関連に関し検討中である。

E. 結論

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Koga Y, Ishibashi M, Ueki I, Yatsuga S, Fukiyama R, Akita Y, Matsuishi T: Effects of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS. *Neurology* 2002; 58:287-288.

Koga A, Koga Y, Akita Y, Fukiyama R, Ueki I, Yatsuga S, Matsuishi T: Increased mitochondrial processing intermediates associated with three tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene mutations. *Neuromuscular Dis* 2003; 13:259-262.

Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Tanabe Y, Fujimoto S, Matsuishi T: L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. *Neurology* 2005 Feb;64(4):710-712.

Povalko N, Zakharova E, Rudenskaia G, Akita Y, Hirata K, Matsuishi T, Koga Y. A new sequence variant in mitochondrial DNA associated with high penetrance of Russian Leber hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion* 2005 (in press)

## 2. 学会発表

古賀靖敏、柗山了、植木勲、秋田幸大、松石豊次郎：ミトコンドリアRNAプロセッシング異常を来すMELAS型点変異。第105回日本小児科学会。2002.4.19 (名古屋)

古賀靖敏、秋田幸大、植木勲、松石豊次郎：MELAS発作予防におけるL-アルギニンの治療効果：急性治療と緩解期の発作予防における評価。第2回ミトコンドリア研究会年会。2002.12.21 (東京)

Koga Y, Akita Y, Ueki I, Fukiyama R, Matsuishi T. Novel Therapeutic Trial of L-arginine on Acute Phase of Stroke in MELAS. 第76回日本生化学会大会シンポジウム「ミトコンドリアの多様性と機能障害」。2003.10.15-18 (横浜)

古賀靖敏、秋田幸大、松石豊次郎：ミトコンドリア脳筋症(MELAS)のL-アルギニン療法。第46回日本先天代謝異常学会。2003.11.20-22 (松江)

伊藤晋一、植木勲、西岡淳子、秋田幸大、古賀敦子、古賀靖敏、松石豊次郎：MELASの自然歴。第424回日本小児科学会、福岡地方会例会。2003.4.12 (福岡)

植木勲、秋田幸大、柗山了、古賀靖敏、松石豊次郎：ミトコンドリアtRNA遺伝子異常の遺伝子検索システム。第45回日本小児神経学会。2003.5.22-24 (福岡)

平田孝治、秋田幸大、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏。マウス脳神経終末アミノ酸の動態。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

石田香織、西岡淳子、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏。ミトコンドリアDNA全周シークエンスシステムの構築。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

秋田幸大、柗山了、平田孝治、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、富田祐子、古賀靖敏。頭痛を伴う意識消失発作と糖尿病を呈するミトコンドリア機能異常症と考えられた症例。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

西岡淳子、石田香織、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏。発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例：ミトコンドリア全周シークエンス解析法をふまえて。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

古賀靖敏、秋田幸大、西岡淳子、柗山了、植木勲、松石豊次郎：MELASの脳卒中様発作急性期および寛解期におけるL-アルギニン療法の効果。第107回日本小児科学会総合シンポジウム3「小児の難病はどこまで治るようになったか」。2004.4.9-11 (岡山)

西岡淳子、古賀靖敏、秋田幸大、植木勲、後藤憲志、江上公康、柗山了、松石豊次郎：発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例：ミトコンドリア全周解析法をふまえて。第107回日本小児科学会。2004.4.9-11 (岡山)

秋田幸大、柗山了、植木勲、西岡淳子、古賀靖敏、松石豊次郎：意識消失発作を契機に糖尿病と診断され、mtDNA異常G3316Aを認めた症例。第107回日本小児科学会。2004.4.9-11 (岡山)

古賀靖敏、秋田幸大、西岡淳子、松石豊次郎：MELASにおけるL-アルギニン療法。第45回日本神経学会。2004.5.11-14 (東京)

後藤憲志、西岡淳子、秋田幸大、江上公康、八ッ賀秀一、古賀靖敏、松石豊次郎：劇症型転帰を取ったミトコンドリア脳筋症の一例。第430回日本小児科学会福岡地方会。2004.6.26 (福岡：九州大学)

古賀靖敏、秋田幸大、西岡淳子、Povalko Nataliya、松石豊次郎：MELAS急性期および寛解期におけるL-アルギニン療法。第46回日本小児神経学会。2004.7.15-17 (東京)

西岡淳子、秋田幸大、古賀靖敏、松石豊次郎：発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例：ミトコンドリア全周解析法をふまえて。第46回日本小児神経学会。2004.7.15-17 (東京)

秋田幸大、西岡淳子、古賀靖敏、松石豊次郎：老化促進モデルマウス(Klotho KOマウス)におけるミトコンドリアエネルギー代謝。第46回日本小児神経学会。2004.7.15-17 (東京)

Povalko Nataliya、秋田幸大、西岡淳子、古賀靖敏：ロシア人Leber遺伝性視神経萎縮症家系における全周ミトコンドリアDNA解析。第46回日本小児神経学会。2004.7.15-17 (東京)

Hirata K, Akita Y, Koga Y: Effect of L-arginine on the transmission of neurotransmitter and mitochondrial respiration in mouse brain. 第77回日本生化学会。2004.10.13-16 (横浜)

平田孝治、秋田幸大、Povalko Nataliya、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏：老化モデルマウスと正常加齢マウスのミトコンドリアエネルギー代謝・組織化学的相関。第4回日本ミトコンドリア研究会年会。2004.12.16-19 (東京)

Povalko N, Akita Y, Hirata K, Nishioka J, Koga Y: A novel point mutation associated with high penetrance of Russian Leber's hereditary optic neuropathy. 第4回日本ミトコンドリア研究会年会。2004.12.16-19 (東京)  
Koga Y, Koga A, Akita Y, et al. Mitochondrial RNA processing intermediates showed dominant negative effects in mitochondrial myopathies. International Congress of Neuromuscular Disorders. 2002.7.6

(Vancouver, Canada)

Koga Y, Koga A, Akita Y, Ueki I, Fukiyama R, Matsuishi T. L-arginine ameliorates the cerebral hemodynamics in the acute episodes of MELAS. 127th American Neurological Association Annual meeting, 2002.10.15 (New York, USA)

Koga Y, Akita Y, Ueki I, Koga A, Matsuishi T. MELAS and L-arginine Therapy. The American society of human genetics 53rd Annual Meeting. 2003.11.4-8 (Los Angeles)

Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Povalko N, Matsuishi T: MELAS and L-arginine Therapy. 6th European Meeting on Mitochondrial Pathology.2004.6.30- 7.4 (Nijmegen, Holland)

Povalko N, Zakharova E, Akita Y, Nishioka J, Koga Y: Entire mtDNA sequence analysis in Russian LHON family. 6th European Meeting on Mitochondrial Pathology.2004.6.30- 7.4 (Nijmegen, Holland)

Akita Y, Hirata K, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Mitochondrial energy metabolism in the klotho KO mouse. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

Hirata k, Akita Y, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Effect of L-arginine on the neurotransmission and the mitochondrial respiration of mice brain synaptosome. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

Ishida K, Akita Y, Povalko N, Hirata K, Nishioka J, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: The entire mitochondrial DNA analysis of 9 MELAS patients with an A3243G mutation. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

SPM-SPECT法によるMELAS脳卒中様発作急性期の脳血流量に関する研究

分担研究者 西岡淳子 久留米大学医学部助手

研究要旨 ミトコンドリア脳筋症(MELAS)患者に対して、超音波診断装置を用いて血管内皮機能の検討を行った。MELAS患者では正常群に対して有意に血管内皮機能の低下を認めた。血管内皮機能低下はミトコンドリアのエネルギー産性系酵素の異常による血管内皮からの一酸化窒素(NO)の放出障害であることが示唆された。

A. 研究目的

MELASの脳卒中様発作急性期の脳血流に関し、血流低下もしくは血流増加と報告も様々であり、未だ一定の見解には達していない。今回、脳血流動態を明らかにする目的で、発作急性期における大脳皮質および白質の脳血流量をSPM-SPECTを用いて評価した。

B. 研究方法

対象は、遺伝子解析により確定診断されたMELAS患者で脳卒中様発作開始後5時間以内で脳血流を解析出来た4名である。MRI検査はT1強調、T2強調、Flair像およびdiffusion像を撮影した。SPM-SPECTは、99mTc-ECDによる脳SPECTを施行し、SPM (Statistical Parametric Mapping) 統計学的画像解析ソフト (SPM99・3D-SSP)を用いて病変部位の脳血流量と併せて機能的画像解析を行った。

C. 研究結果

MELASの脳卒中様病変は、発作早期には病変部に一致し有意な脳血流の低下を示した（正常control群と比較し $p < 0.01$ で有意差があると判定した）。この脳血流の低下は、発作後2時間で確認された症例もあり、その後の脳血流状態を経過観察している。

D. 考察

我々は発作早期の脳血流量をSPM-SPECTにより評価し、病変部位の脳血流量が有意に低下していることを確認した。SPMは、正規化、平滑化、統計解析の手順を踏んで行われる解析法であり、そのメリットは、正常control群と比較することで数学的に客観的に脳血流SPECTを評価する点である。今回、MELASの脳卒中様発作急性期における血流低下を有意に示した点に

おいてMELASの病態解明に迫る知見と考えられた。また、今回の結果は、MELAS急性発作期の血管障害の改善を目的としたL-アルギニン療法の優位性を指示する結果となった。

E. 結論

MELAS患者でのL-アルギニン療法は、血管内皮機能低下による脳卒中様病態と深く関わっており、血管拡張能が効能効果に関与する結果を指示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

西岡淳子、古賀靖敏. 小児の悪性高熱症、悪性症候群、横紋筋融解症の臨床像と病態および治療. 小児科 2003; 44(13): 2109-2117.

Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Tanabe Y, Fujimoto S, Matsuishi T: L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. Neurology 2005 Feb;64(4):710-712.

学会発表

伊藤晋一、植木勲、西岡淳子、秋田幸大、古賀敦子、古賀靖敏、松石豊次郎: MELASの自然歴. 第424回日本小児科学会、福岡地方会例会. 2003.4.12 (福岡)

平田孝治、秋田幸大、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏. マウス脳神経終末アミノ酸の動態. 第3回日本ミトコンドリア研究会年会. 2003.12.18-20 (福岡)

石田香織、西岡淳子、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏. ミトコンドリアDNA全周シーケンシステム構築. 第3回日本ミトコンドリア研究会年会. 2003.12.18-20 (福岡)



秋田幸大、柗山了、平田孝治、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、富田祐子、古賀靖敏。頭痛を伴う意識消失発作と糖尿病を呈するミトコンドリア機能異常症と考えられた症例。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

西岡淳子、石田香織、秋田幸大、平田孝治、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏。発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例：ミトコンドリア全周シークエンス解析法をふまえて。第3回日本ミトコンドリア研究会年会。2003.12.18-20 (福岡)

古賀靖敏、秋田幸大、西岡淳子、柗山了、植木勲、松石豊次郎：MELASの脳卒中様発作急性期および寛解期におけるL-アルギニン療法の効果。第107回日本小児科学会総合シンポジウム3「小児の難病はどこまで治るようになったか」。2004.4.9-11 (岡山)

西岡淳子、古賀靖敏、秋田幸大、植木勲、後藤憲志、江上公康、柗山了、松石豊次郎：発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例：ミトコンドリア全周解析法をふまえて。第107回日本小児科学会。2004.4.9-11 (岡山)

秋田幸大、柗山了、植木勲、西岡淳子、古賀靖敏、松石豊次郎：意識消失発作を契機に糖尿病と診断され、mtDNA異常G3316Aを認めた症例。第107回日本小児科学会。2004.4.9-11 (岡山)

古賀靖敏、秋田幸大、西岡淳子、松石豊次郎：MELASにおけるL-アルギニン療法。第45回日本神経学会。2004.5.11-14 (東京)

後藤憲志、西岡淳子、秋田幸大、江上公康、八ツ賀秀一、古賀靖敏、松石豊次郎：劇症型転帰を取ったミトコンドリア脳筋症の一例。第430回日本小児科学会福岡地方会。2004.6.26 (福岡：九州大学)

古賀靖敏、秋田幸大、西岡淳子、Povalko Nataliya、松石豊次郎：MELAS急性期および寛解期におけるL-アルギニン療法。第46回日本小児神経学会。2004.7.15-17 (東京)

西岡淳子、秋田幸大、古賀靖敏、松石豊次郎：発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例：ミトコンドリア全周解析法をふまえて。第46回日本小児神経学会。2004.7.15-17 (東京)

秋田幸大、西岡淳子、古賀靖敏、松石豊次郎：老化促進モデルマウス (Klotho KO マウス) におけるミトコンドリアエネルギー代謝。第46回日本小児神

経学会。2004.7.15-17 (東京)

Povalko Nataliya、秋田幸大、西岡淳子、古賀靖敏：ロシア人Leber遺伝性視神経萎縮症家系における全周ミトコンドリアDNA解析。第46回日本小児神経学会。2004.7.15-17 (東京)

平田孝治、秋田幸大、Povalko Nataliya、西岡淳子、石田香織、西村美紀、光益千秋、古賀靖敏：老化モデルマウスと正常加齢マウスのミトコンドリアエネルギー代謝・組織化学的相関。第4回日本ミトコンドリア研究会年会。2004.12.16-19 (東京)

Povalko N, Akita Y, Hirata K, Nishioka J, Koga Y: A novel point mutation associated with high penetrance of Russian Leber's hereditary optic neuropathy. 第4回日本ミトコンドリア研究会年会。2004.12.16-19 (東京)

Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Povalko N, Matsuishi T: MELAS and L-arginine Therapy. 6th European Meeting on Mitochondrial Pathology. 2004.6.30- 7.4 (Nijmegen, Holland)

Povalko N, Zakharova E, Akita Y, Nishioka J, Koga Y: Entire mtDNA sequence analysis in Russian LHON family. 6th European Meeting on Mitochondrial Pathology. 2004.6.30- 7.4 (Nijmegen, Holland)

Akita Y, Hirata K, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Mitochondrial energy metabolism in the klotho KO mouse. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

Hirata k, Akita Y, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Effect of L-arginine on the neurotransmission and the mitochondrial respiration of mice brain synaptosome. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

Ishida K, Akita Y, Povalko N, Hirata K, Nishioka J, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: The entire mitochondrial DNA analysis of 9 MELAS patients with an A3243G mutation. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定も含む。)

なし

ミトコンドリア脳筋症における血管内皮機能に関する研究

分担研究者 八ツ賀秀一 久留米大学医学部助手

研究要旨 ミトコンドリア脳筋症(MELAS)患者に対して、超音波診断装置を用いて血管内皮機能の検討を行った。MELAS患者では正常群に対して有意に血管内皮機能の低下を認めた。血管内皮機能低下はミトコンドリアのエネルギー産生系酵素の異常による血管内皮からの一酸化窒素(NO)の放出障害であることが示唆された。

A. 研究目的

ミトコンドリア脳筋症(Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic acid stroke like episodes: MELAS)はミトコンドリアのエネルギー産生系酵素の遺伝的異常により引き起こされる難治性進行性疾患である。MELAS患者における血管内皮機能を検討することである。

B. 研究方法

筋生検にてMELASと診断された14例（男性9例 女性5例）、年齢中央値 12.5歳（8-45歳）を対象とした。対照は年齢と性別を一致させた健康者13例とした。

方法 血管内皮依存性血管拡張を検査するためにflow mediated vasodilatation (FMD) を計測した。超音波装置としてPhilips社製SONOS 5500G及びGE社製 VIVID 7を用い、超音波探触子は 10 MHzのものを使用した。上腕を200mmHgの圧で4分30秒駆血、その前後における肘動脈の血管径拡張の変化を計測しその拡張率(%FMD)を求めた。血管内皮非依存性血管拡張を検討するために、ニトログリセリン0.6mg舌下投与し、血管径拡張の拡張率(dilatation of Nitroglycerine: NTG-D)を求めた。

C. 研究結果

MELAS患者における%FMDは対照に比較して著明に低下していた(3.5±0.9% vs. 14.4±0.5% p<0.05)。ニトログリセリン舌下投与におけるMELAS患者と対照に比較では差は認めなかった(17.7±2.1% vs. 22.1±1.8%)。

D. 考察

MELAS患者において血管内皮依存性血管拡張

は著明に低下しており、血管内皮機能低下が示唆された。

E. 結論

MELAS患者では、血管内皮機能低下が存在し、脳卒中様病態と深く関わっている事が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Koga Y, Ishibashi M, Ueki I, Yatsuga S, Fukiyama R, Akita Y, Matsuishi T: Effects of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS. *Neurology* 2002; 58:287-288.

Koga A, Koga Y, Akita Y, Fukiyama R, Ueki I, Yatsuga S, Matsuishi T: Increased mitochondrial processing intermediates associated with three tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene mutations. *Neuromuscular Dis* 2003; 13:259-262.

Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Tanabe Y, Fujimoto S, Matsuishi T: L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. *Neurology* 2005 Feb;64(4):710-712.

学会発表

後藤憲志、西岡淳子、秋田幸大、江上公康、八ツ賀秀一、古賀靖敏、松石豊次郎：劇症型転帰を取ったミトコンドリア脳筋症の一例。第430回日本小児科学会福岡地方会。2004.6.26（福岡：九州大学）

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定も含む。）なし

小児期発症のミトコンドリア脳筋症患者の末期看護に関する研究

分担研究者 久木原博子 久留米大学医学部看護師

**研究要旨** ミトコンドリアは人のすべての細胞中に存在しエネルギー産生に関与する細胞内の小器官で、独自の遺伝子群（ミトコンドリア遺伝子：mtDNA）を内包している。その異常によりおこるミトコンドリア脳筋症は、発症年齢も幼児期から成人期まで幅広く、臨床症状も多彩である。多くは知的障害やてんかんてんかんで発症し、脳卒中様発作を反復しながら慢性的に進行する。発症から死に至る経過もさまざま、末期には多発する疾患群と脳梗塞後の後遺障害が複合的に重篤化する。医師間でも認知度が低い疾患で、いままで原因の分からなかった小児疾患に本症が潜在している可能性が考えられる。一方、診断や治療に対する研究も活発になされている。看護領域ではG.Hilton<sup>3)</sup>の疾病コントロール、遺伝相談を含む患者・家族への精神的サポートについての報告はあるが、ミトコンドリア脳筋症患者の現実に即した効果的な看護を明らかにした研究は見当たらない。

本研究では、幼児期、学童期を小柄な吐きやすい子として成長し、13歳で確定診断がつき、典型的経過をたどったミトコンドリア脳筋症患者の看護について、盲・聾・痴呆をきたし重度・重複障害に至った末期看護に焦点を絞り明らかにすることである。

A. 研究目的

ミトコンドリア脳筋症の看護における問題を明確にする事は、本症の社会的援助制度を構築する上で重要である。MELAS患者における看護の実際で、どのような介護問題が存在するのかが、実際の事例を検討した。

B. 研究方法

ミトコンドリア脳筋症患者で脳血管性痴呆症を発症した22歳女性の入院に際して問診を行った。週3~4回訪室し、付き添いの母親とともに看護援助（手浴・足浴等）を行ない、母親との信頼関係を築いた上で患児の情報を収集し、同時に患児の状況を観察した。看護訪室回数：（述べ53回、1回あたり約30分~2時間）。聞き取り内容：母親からは心配事や困っていること、看護師からは看護実践内容。聞き取り回数：母親3回、看護師2回。訪室時の患者情報と母親と看護士からの聞き取り内容は直後にできるだけ詳しく記録した。記録内容と診療録の内容を再構成した。再構成した内容をデータとして、①身体的側面、②心理社会的側面から研究者間で分析した。分析の視点は、重度、重複障害をきたした患者の残存機能の保持、残存機能を活用したコミュニケーションの方法、患者の尊厳を優先した日常生活の援助であった。

倫理的配慮

文書による研究の趣旨を説明した後に研究の協力を母親に依頼し、対象者の権利の擁護に関する事項を口頭で説明し、同意書の署名による承諾を得た。患児は盲・聾・痴呆のため判断不能であり、保護者である母親の承諾のみを得た。

1. 患者紹介

24歳、女性、mtDNA(塩基配列変異A3243G)の85%の点変異を伴うミトコンドリア脳筋症。小児科病棟個室入院中

家族構成と家族歴

家族は母親と姉の3人。母親はパート勤務を辞めて患者の入院に付き添う。母親はmtDNAの5%の点変異（塩基配列変異A3243G）があるが健康。姉はmtDNAの15%の点変異で心臓弁膜症があるが社会生活に支障はない。母方の親族には、低身長・心臓病・高血圧・糖尿病・てんかんなどミトコンドリア脳筋症特有の疾患を有する者が多い。

2. 入院までの経過

初発症状は下肢痛による歩行困難（13歳）で、一過性の脳卒中様発作を繰り返しながら17歳まで社会生活を継続できた。その後、発作の頻発による後遺障害が重篤化するなか、今回痙攣重積で緊急入院する22歳まで、短期入院（数日から数週間）のみで在宅生活を継続できた（図1）。脳卒中様発作時の症状としては、頭痛・嘔吐・眼症状・痙

攣があった。

### 3. 入院時の状態

身体的側面：前頭葉の血流障害と脳萎縮により後遺障害が改善することなく盲・聾・痴呆と意思の疎通もなく、視覚障害の訴えと痙攣重積があった。入院直後患者は突然の重複障害となり処置時には手当たり次第物を投げる、掴みかかるなどの行動がみられた。

心理社会的側面：視覚障害者年金受給中、慢性特定疾患の認定

医師からの説明：脳が萎縮した末期状態、治療法はない、これまでの対症療法で症状は改善しなくなった。呼吸が急に止まることもあり得る。

## C. 研究結果

### 1. 看護上の問題

- 1) 脳卒中様発作と脳萎縮に伴う呼吸停止の可能性
- 2) 認知障害(痴呆)、視覚・聴覚障害(盲・聾)によるコミュニケーション障害
- 3) 母親(家族)の不安

### 2. 看護目標

- 1) 脳卒中様発作を誘発しない
- 2) 患者の不安が軽減できる
- 3) 母親(家族)の不安が軽減できる

### 3. 看護の実際

#### 1) 脳卒中様発作を誘発しない

##### (1) 異常の早期発見

不穏状態や痙攣などの前駆症状は、患者からの言語による訴えは期待できないため、検温や与薬などの訪室時の観察(視診・触診・聴診)が以前にも増して重要になった。入院当初はバイタルサイン時に体に触れることで暴れていたため、看護師間で患者の腋窩をトントンと軽く叩く合図を取り決め行うことで測定がスムーズになった。また、常時付き添っている母親からの情報も異常の早期発見のための重要な判断材料とした。

##### (2) 生活指導

エネルギーの消費を可能な限り抑える為の感染予防や十分な栄養あるいは休息が必要であることを母親に説明し、看護者間でも感染予防、排便コントロール、心理的ストレスを少なくするなどの生活指導を申し合わせた。鎮静剤を使う時間や下剤の使用については母親も加えて検討し実施した。しかし、母親は不穏状態や痙攣に対する鎮静剤や抗痙攣剤の服薬を、「薬で眠らされる」と、しばしば勝手に薬の量を減量することがあり、患者はその都度不穏状態を来

たした。しかし、そのことで脳卒中様発作を誘発することはなかった。

### 2) 不安が軽減できる

#### (1) 合図を決め行う

痴呆による失読症・失語症は、コミュニケーションをさらに困難にした。加えて視覚聴覚障害などの重複障害も進行し、処置のために体に触れる時は当然のこととして突然に理解できない場面で暴れた。そのため、看護者間では対応に困り母親も加えて検討した結果、患者の意味のないと思われる言葉や行動には、患者の不安が潜在しているのではないかと考え、次のように合図を決めた(表1)。その結果、時には突然暴れることもあったが次第に回数は少なくなった。

#### (2) 嗅覚や触覚などの残存機能を活用する

重複障害により状況が判断できないことから、不安が生じると考え日常生活場面における触覚や嗅覚などの残存機能を活用した不安の軽減に努めた。具体的には患者の好物であったメロンの匂いを嗅がせたり、好きだったぬいぐるみを渡し触らせたりした。

#### 3) 母親(家族)の不安が軽減できる

##### (1) 母親のさまざまな不安や不満(表2)に対する援助

状況を受容できない母親に対して、母親の話し相手になり気持ちを受け止める関わりをした。

##### ① コミュニケーションがとれないことに対する不安

母子間で感情の交流が閉ざされていることに対しては、母親が語る患者の思い出話の傾聴や可能な範囲での患者に対する生活援助への参加を働きかけた。

##### ② 医師や看護師の対応に対する不満

さまざまな母親の不満や不安に対する話を傾聴した。また患者が母親に殴りかかった場面で「患者の言葉や動作は、病氣(脳)がさせていることで患者がやりたくてやっているのではない」などと看護師は母親の思いを受け止め共感するよう努めた。

##### ③ 社会サービスについての不満

認知度の低い疾患に対する医療体制の不備や社会サービスの未整備などさまざまな不満に対する話を傾聴し、希望する社会サービスを最大限利用できるように援助した。

##### ④ 遺伝病

遺伝に関するさまざまな不安や疑問など治療に関することでも傾聴し、必要時医師に母親への説明を依頼した。